·论著·

四妙汤对类风湿关节炎大鼠维生素 D 系统及中性粒细胞胞外诱捕网的影响研究

罗书曼[1]，朱星[1]，陈帅[1]，李文[1]，董右青[1]，何昌禄[2]，周艳[2]，陈云志[1*]

【摘要】 **背景** 随着我国进入人口老龄化加速发展期，类风湿关节炎（RA）患病比例不断增加，给社会和家庭造成沉重负担。四妙汤中药物的有效成分确有改善 RA 的作用，但分析方剂的作用及机制缺乏相关研究。**目的** 观察四妙汤对胶原诱导法（CIA）建立的类风湿关节炎大鼠的干预效果及其对维生素 D 系统及中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）的影响。**方法** 2021 年 11 月——2023 年 1 月选取 SPF 级 6 ~ 7 周龄 SD 雌性大鼠 70 只，采用随机数字表法将大鼠随机分为空白组（Control 组）、模型组（Model 组）、甲氨蝶呤组（MTX 组）、维生素 D 组（VD 组）、四妙汤低剂量组（SMT-L 组）、四妙汤中剂量组（SMT-M 组）、四妙汤高剂量组（SMT-H 组），每组 10 只。通过胶原诱导法建立滑膜型关节炎（CIA）大鼠模型，于造模 7 d 后开始灌胃治疗。观察药物干预前后大鼠体质量、一般状况，评估踝部肿胀程度，测量各组大鼠关节炎指数（AI）评分。药物干预结束后采用苏木素 - 伊红（HE）染色观测大鼠关节组织病变情况。采用免疫组化法检测滑膜组织髓过氧化物酶（MPO）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）表达情况，酶联免疫吸附测定（ELISA）检测大鼠血清中白介素 6（IL-6）、25- 羟基维生素 D〔25（OH）D_3〕、NETs 水平，蛋白质印迹法（Western Blot）检测关节滑膜组织 24- 羟基化酶（CYP24A1）、1-α 羟化酶（CYP27B1）、MPO、维生素 D 受体（VDR）、弹性蛋白酶（NE）表达水平。**结果** 药物干预第 7 天 VD 组、SMT-L 组、SMT-H 组大鼠体质量高于 Model 组，第 14 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-H 组高于 Model 组，第 21、28 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组高于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。药物干预第 0 天 Model 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组大鼠踝部肿胀程度高于 Control 组，第 7 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组低于 Model 组，第 14 天 Model 组高于 Control 组，SMT-M 组高于 Model 组，第 21 天 Model 组高于 Control 组、MTX 组，低于 VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组，第 28 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组低于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。第 14 天 SMT-H 组大鼠 AI 评分低于 Model 组，第 21 天 MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-H 组低于 Model 组，第 28 天 MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组 o、SMT-H 组低于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。Model 组大鼠滑膜组织衬里下层大量炎性细胞浸润、滑膜细胞异常增生、关节面被破坏出现不同程度的纤维组织增生；与 Model 组比较，各给药组大鼠滑膜组织的病理状态均有改善，其中 MTX 组、SMT-H 组改善较为明显。免疫组化法结果显示，7 组大鼠滑膜组织 MPO、TNF-α 表达水平比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 Model 组 MPO、TNF-α 高于 Control 组，MTX 组、VD 组、SMT-H 组 MPO、TNF-α 低于 Model 组，SMT-M 组 TNF-α 低于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。Model 组 IL-6、NETs 高于 Control 组，25（OH）D_3 低于 Control 组；MTX 组、VD 组、SMT-H 组 IL-6、NETs 低于 Model 组，25（OH）D_3 高于 Model 组；SMT-M 组 NETs 低于 Model 组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。Model 组 CYP24A1 高于 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-M 组、SMT-H 组，CYP27B1、VDR 低于 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-M 组、SMT-H 组，MPO 高于 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组，NE 高于 Control 组、VD 组、SMT-M 组、SMT-H 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。**结论** 四妙汤可能通过调控维生素 D 系统抑制 NETs 的形成，进而治疗 RA。

【关键词】 类风湿关节炎；四妙汤；维生素 D；维生素 D 系统；中性粒细胞胞外诱捕网

【中图分类号】 R 593.22 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0328

【引用本文】 罗书曼，朱星，陈帅，等．四妙汤对类风湿关节炎大鼠维生素 D 系统及中性粒细胞胞外诱捕网的影响研究［J］．中国全科医学，2023.［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0328.［www.chinagp.net］

基金项目：国家自然科学基金（82260890）；教育厅滚动支持省属高校科研平台团队项目〔黔教技（2022）023；黔科合基础 -ZK［2022］一般 001〕

1.550025 贵州省贵阳市，贵州中医药大学 2.554300 贵州省铜仁市德江县民族中医院推拿科

*通信作者：陈云志，教授 / 博士生导师；E-mail：chenyunzhi270@gzy.edu.cn

本文数字出版日期：

LUO S M，ZHU X，CHEN S，et al. Effect of Simiao decoction on vitamin D system and neutrophil extracellular traps in rats with rheumatoid arthritis［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

Effect of Simiao Decoction on Vitamin D System and Neutrophil Extracellular Traps in Rats with Rheumatoid Arthritis

LUO Shuman[1]，*ZHU Xing*[1]，*CHEN Shuai*[1]，*LI Wen*[1]，*DONG Youqing*[1]，*HE Changlu*[2]，*ZHOU Yan*[2]，*CHEN Yunzhi*[1*]

1.Guizhou University of Chinese Medicine，Guiyang 550025，China

2.Department of Massage Therapy，Dejiang County Hospital of Traditional Chinese Medicine，Tongren 554300，China

Corresponding author：CHEN Yunzhi，Professor/Doctoral supervisor；E-mail：chenyunzhi270@gzy.edu.cn

【Abstract】 Background As China enters the period of accelerated development of population aging，the proportion of rheumatoid arthritis cases is increasing，causing a serious burden on society and families. The active ingredients in simiao decoction have improved effect，but there is a lack of relevant studies to analyze the action and mechanism of prescriptions. **Objective** To observe the intervention effect of simiao decoction on rats with rheumatoid arthritis established by collagen-induced arthritis（CIA）and its effect on vitamin D system and neutrophil extracellular traps（NETs）. **Methods** From November 2021 to January 2023，70 SPF grade SD female rats aged 6 to 7 weeks were selected. The rats were randomly divided into the blank group（control group），model group（model group），methotrexate group（MTX group），vitamin D group（VD group），Simiao decoction low-dose group（SMT-L group），Simiao decoction medium-dose group（SMT-M group）and Simiao decoction high-dose group（SMT-H group）by random number table method，with 10 rats in each group. The rat model of synovial arthritis（CIA）was established by collagen induction method and the gavage treatment was started 7 d after modeling. The body mass and general condition of rats were observed before and after drug intervention，the degree of ankle swelling was assessed，and the arthritis index（AI）score of rats in each group was measured. Hematoxylin-eosin（HE）staining was used to observe the joint tissue lesions of rats. after drug intervention. The expressions of myeloperoxidase（MPO）and tumor necrosis factor α（TNF-α）in synovium tissue were detected by immunohistochemical method，and the levels of interleukin6（IL-6），25-hydroxyvitamin D［25（OH）D_3］and NETs in serum of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）. The expression levels of 24-hydroxylase（CYP24A1），1-α hydroxylase（CYP27B1），MPO，vitamin D receptor（VDR）and elastase（NE）in synovial tissue of joint were detected by Western Blot. **Results** The body mass of rats in the VD，SMT-L and SMT-H groups was higher than that in the model group on the 7th day of drug intervention，the body mass in the control，MTX，VD，SMT-L and SMT-H groups was higher than that in the model group on the 14th day，the body mass in the control，MTX，VD，SMT-L，SMT-M and SMT-H groups was higher than the model group on the 21st and 28th days，and the difference was statistically significant（$P<0.05$）. The degree of ankle swelling in the model，MTX，VD，SMT-L，SMT-M and SMT-H groups was higher than that in the control group on day 0 of drug intervention，the degree of ankle swelling in the control，MTX，VD，SMT-L，SMT-M and SMT-H groups was lower than that in the model group on day 7，the degree of ankle swelling in the model group was higher than the control group，the SMT-M group was higher than the model group on day 14，the degree of ankle swelling in the model group was higher than the control and MTX groups and lower than the VD，SMT-L，SMT-M and SMT-H groups on day 21，the degree of ankle swelling in the control，MTX，VD，SMT-L，SMT-M and SMT-H groups was higher than the model group，and the difference was statistically significant（$P<0.05$）. The AI score of rats in the SMT-H group was lower than that in the model group on day 14，the AI score in the MTX，VD，SMT-L and SMT-H groups was lower than that in the model group on day 21，the score of rats in the MTX，VD，SMT-L，SMT-M，and SMT-H groups was lower than that in the model group on day 28，the difference was statistically significant（$P<0.05$）. In the model group，the rat synovial tissue was infiltrated with a large number of inflammatory cells in the lower layer of synovial tissue lining，synovial cells were abnormally hyperplasia，articular surface was destroyed，and fibrous tissue hyperplasia occurred in different degrees. Compared with the model group，the pathological status of synovial tissue of rats in all drug administration groups was improved，especially in the MTX and SMT-H groups. Immunohistochemical results showed significant differences in the expression levels of MPO and TNF-α in synovial tissue among the 7 groups（$P<0.05$），MPO and TNF-α in the model group were higher than those in the control group，while MPO and TNF-α in the MTX，VD and SMT-H groups were lower than those in the model group，TNF-α in the SMT-M group was lower than that in the model group，and the difference was statistically significant（$P<0.05$）. IL-6 and NETs in the model group were higher than those in the control group，and 25（OH）D_3 was lower than that in the control group. IL-6 and NETs in the MTX，VD and SMT-H groups were lower than those in the model group，and 25（OH）D_3 was higher than that in the model group. NETs in the SMT-M group were lower than those in the model group，and the difference was statistically significant（$P<0.05$）. CYP24A1 in the model group was higher than that in the

control, MTX, VD, SMT-M and SMT-H groups, while CYP27B1 and VDR in the model group were lower than those in the control, MTX, VD, SMT-M and SMT-H groups, MPO was higher than that of the control, MTX, VD, SMT-L, SMT-M and SMT-H groups, and NE was higher than the control, VD, SMT-M and SMT-H groups, and the difference was statistically significant (P<0.05) . **Conclusion** Simiao decoction may inhibit the formation of NETs by regulating the vitamin D system, thereby treating RA.

【**Key words**】 Rheumatoid arthritis; Simiao decoction; Vitamin D; Vitamin D system; Neutrophil extracellular traps

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种慢性、系统性的自身免疫性疾病，主要病理特征为持续性滑膜炎和滑膜增生。目前全球RA患病率约为1%[1]。RA致死率不高，但有较高致残率，对患者身体机能及生活质量影响较大，有“不死癌症”之称。RA患者发生心血管疾病等并发症的概率远高于普通人，增加了患者因心血管疾病死亡的风险，而糖皮质激素作为RA常用治疗药物，在临床使用时增加了RA合并心血管疾病患者的死亡率[2]。因此寻找低毒高效的RA治疗药物是目前公共卫生系统的共同挑战。

流行病学数据显示，维生素D（VD）缺乏与自身免疫性疾病有关，其中血清25-羟基维生素D〔25（OH）D_3〕水平与RA发病率和疾病活动之间存在负相关[3]。动物实验研究表明，VD可缓解RA小鼠模型的关节炎症状，降低关节炎评分[4]。临床研究表明，使用VD补充剂可降低RA发展风险[5]。VD、维生素D受体（VDR）及相关代谢酶共同组成维生素D系统，维生素D系统通过多种途径参与免疫调节，其中通过抑制树突状细胞、T细胞、B细胞的免疫反应导致肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白介素6（IL-6）等细胞因子产生减少，抑制RA的发生发展[6]。中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）是中性粒细胞受到刺激形成的以DNA为骨架的网状结构[7]，其形成过程被称为中性粒细胞胞外诱捕网凋零（NETosis）。NETs的过度表达在RA病理过程中发挥重要作用，促进抗瓜氨酸化抗体（ACPA）的产生，加重RA进程[8]。研究表明，VD可通过降低NETs标志物髓过氧化物酶（MPO）活性，抑制NETs形成[9]；活性形式的VD，即1，25-二羟基维生素D〔1，25（OH）$_2D_3$〕可降低NETosis活性，抑制NETs形成[10]。

中医将RA归属“痹证”范畴[11]。“痹”者，“闭”也，血气凝滞不通也[12]。气血运行不畅在痹证的发病过程中起关键作用，调畅气机、活血通络开痹是治疗重点。四妙汤见于清·蒋示吉《医宗说约》，是由两个药对组成的药少力专的方剂，黄芪和当归组成当归补血汤，补气生血，金银花与甘草组为银花甘草汤，清热解毒，方中四药合伍，共奏益气合血、托里解毒功效[13]。研究表明当归补血汤对骨质疏松大鼠模型维生素D系统有调节作用[14]，当归补血汤含药血清对RA滑膜炎症有抑制作用[15]。基于中医理论及前期研究成果，故推测，四妙汤通过调节维生素D系统影响NETs的形成有效改善RA。因此，本研究通过胶原诱导法建立滑膜型关节炎（CIA）大鼠模型，深入探索四妙汤治疗RA的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验时间 2021年11月——2023年1月。

1.1.2 实验动物 SPF级6～7周龄SD雌性大鼠70只，体质量200~220 g，购自贵州中医药大学实验动物研究所，许可证号：SCXK（黔）2021-0003，所有大鼠在贵州中医药大学实验动物研究所饲养，室温22~25 ℃，相对湿度50%~60%，适应性饲养1周后进行造模实验。本实验所有程序通过贵州中医药大学实验动物研究所动物伦理审查（编号：20210100）。

1.1.3 实验药物和试剂 黄芪（批号：20210503）、当归（批号：20210609）、金银花（批号：20210763）、甘草（批号：20210921）均购自北京同仁堂贵阳药店，上述所有药材经贵州中医药大学方药教研室蒋志滨副教授鉴定为合格中药饮片。甲氨蝶呤片（MTX）（上海上药信谊药厂有限公司，批号：036210906），维生素D滴剂（青岛双鲸药业股份有限公司，批号：2104191），牛Ⅱ型胶原蛋白（上海源叶生物科技有限公司，批号：L22S11C125306），弗氏不完全佐剂（美国SIGMA公司，批号：SLCH4885），冰乙酸（四川西陇科学有限公司，批号：2104131），大鼠IL-6、NETs、25（OH）D_3 ELISA试剂盒（上海茁彩生物科技有限公司，批号：ZC-36404、ZC-54723、ZC-35943），甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体、中性粒细胞弹性蛋白酶（NE）抗体（美国Affinity公司，批号：AF7021、AF0010），1-α羟化酶（CYP27B1）抗体（美国bioss公司，批号：Bs-14146R），MPO抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，批号：22225-1-AP），VDR抗体、24-羟基化酶（CYP24A1）抗体（美国ABclonal公司，批号：A2194、A1805）。

1.1.4 主要仪器 mμlISKANMK3型酶标仪（美国Thermo公司），DYY-6C型电泳仪（北京六一生物科技有限公司），L500-A型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司），光学显微镜（德国Leica公司），Universal Hood Ⅱ型核酸蛋白凝胶成像仪（美国Bio-Rad

公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 四妙汤的制备 四妙汤水煎剂由黄芪、金银花、当归、甘草按照 10∶8∶2∶1 比例配伍组成，将 4 味药材用纯净水浸泡 60 min 后，武火煮沸，转文火煎煮 30 min，取滤液，重复操作，合并两次滤液利用旋转蒸发仪浓缩生药浓度至 0.63 g/mL 备用。

1.2.2 大鼠分组 采用随机数字表法将大鼠随机分为空白组（Control 组）、模型组（Model 组）、甲氨蝶呤组（MTX 组）、维生素 D 组（VD 组）、四妙汤低剂量组（SMT-L 组）、四妙汤中剂量组（SMT-M 组）、四妙汤高剂量组（SMT-H 组），每组 10 只。

1.2.3 CIA 大鼠模型造模 大鼠参考文献[16]造模，用蒸馏水配制 0.05 mol/L 乙酸溶液，将牛Ⅱ型胶原蛋白溶于乙酸溶液中制成浓度为 2 g/L 溶液，4 ℃环境下摇床震荡过夜至完全溶解，隔天冰上操作与弗氏不完全佐剂 1∶1 比例混合制成胶原乳液。分别在大鼠背部、尾根部、双侧后足垫四点皮下各注射胶原乳液 0.1 mL 进行初次免疫，Control 组以相同方式注射等量 0.9% 氯化钠溶液，初次免疫 7 d 后，在大鼠背部及尾根部两点皮下各注射 0.1 mL 乳液加强免疫。以体质量下降，大鼠关节、脚踝及足部出现泛红伴随肿胀作为造模成功的标准。随机抽取 2 只大鼠，采用苏木素 - 伊红（HE）染色观察大鼠滑膜组织的病理学改变，若出现滑膜增生、炎性细胞浸润、纤维组织增生等系列变化，提示 CIA 模型建立成功。

1.2.4 药物干预 于加强免疫 7 d 后开始灌胃治疗，根据成人用量按照人与大鼠体表面积折算等效剂量[17]，SMT-L、SMT-M、SMT-H 组分别给予四妙汤水煎液 3.15 g/kg、6.30 g/kg、12.60 g/kg 灌胃，VD 组给予 VD 滴剂 25 μg/kg，Control 组和 Model 组给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃，甲氨蝶呤组给予 MTX 1.5 mg/kg 灌胃，2 次 / 周，其余各组均为 1 次 /d，药物干预 28 d。

1.3 指标检测

1.3.1 大鼠一般状况及踝部肿胀程度 观察药物干预前后，大鼠体质量、摄食情况、四肢活动情况及皮毛色泽等一般状况。每组选取 10 只大鼠，分别于药物干预第 0、7、14、21、28 天用电子称测量并记录大鼠体质量，用游标卡尺测量大鼠踝部直径，以评估踝部肿胀程度，当前测量直径减去初始测量直径视为肿胀程度。

1.3.2 关节炎指数（AI）评分 分别于药物干预第 0、7、14、21、28 天，每组选取 10 只大鼠，按照 AI 评分标准进行评分并记录。0 分：关节无红肿胀症状；1 分：踝关节轻微肿胀；2 分：踝关节轻度红肿伴足趾有红斑；3 分：踝关节累及足趾中度红肿；4 分：踝关节及全足重度红肿，每只大鼠的四肢累计得分为 AI 评分。

1.3.3 关节滑膜组织病理学检测 药物干预结束后，将大鼠踝关节取下置于 4% 多聚甲醛固定 72 h，脱钙、流水冲洗 24 h、标本脱水、包埋、切片。采用苏木素 - 伊红（HE）染色进行切片，显微镜观测并采集图像分析大鼠关节组织病变情况。

1.3.4 免疫组化法检测滑膜组织 MPO、TNF-α 表达情况 将制备好的滑膜组织切片进行脱蜡水化、磷酸缓冲盐溶液（PBS）冲洗、抗原修复、血清封闭孵育，配置合适浓度的一抗（MPO 1∶40，TNF-α 1∶50）4 ℃孵育过夜，PBS 冲洗后滴加稀释后的相应二抗，37 ℃烘箱孵育 30 min，PBS 冲洗后加入显色液，脱水封片。将切片在显微摄像系统下观察并采集图像，每张切片采集 3 张，使用 HALO 数字病理图像分析工具分析每张图像的 MPO、TNF-α 阳性面积占比。

1.3.5 酶联免疫吸附测定（ELISA）检测大鼠血清中 IL-6、25（OH）D_3、NETs 水平 药物干预结束后，大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉，经腹主动脉取血，室温静置 30 min，4 ℃离心 10 min（3 000 r/min，离心半径 14 cm），分离收集血清，置于 -80 ℃冰箱备用，采用酶联免疫吸附法（ELISA）测定血清 IL-6、25（OH）D_3 水平，采用基于 MPO-DNA 复合物的捕获酶联免疫吸附法测定 NETs 水平，严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，显色后在酶标仪 450 nm 波长条件下依序测量各孔内 OD 值，并根据获得的标准曲线方程，计算样品浓度。

1.3.6 蛋白质印迹法（Western Blot）检测关节滑膜组织 CYP24A1、CYP27B1、MPO、VDR、弹性蛋白酶（NE）表达水平 分离出大鼠踝关节滑膜组织放入 2 mL 研磨管中，按样本比例向管中加入 RIPA 裂解液和钢珠，低温研磨仪研磨 2 次，后设置离心机 4 ℃以 12.000 r/min 离心 5 min，分离出上清液置冰箱 -20 ℃备用。依照 BCA 试剂盒标准蛋白浓度和相应 OD 值，计算样本蛋白浓度。配置电泳胶、上样、电泳、转膜，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST（封闭液）室温下摇床震荡封闭 2 h，TBST 洗膜 3 次，放入孵育盒，加入稀释过的一抗 4 ℃孵育过夜，一抗稀释比例：CYP24A1（1∶1 000）、CYP27B1（1∶1 000）、MPO（1∶2 000）、VDR（1∶1 000）、NE（1∶1 000）。TBST 洗膜 3 次，加入 HRP 标记二抗（1∶600 稀释），37 ℃摇床孵育 2 h，TBST 充分洗膜。最后配置 ECL 显影液，均匀滴加到聚偏二氟乙烯膜上，暗室曝光成像，扫描胶片，用 BandScan 凝胶图像分析软件分析胶片灰度值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 为结果差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况及肿胀度变化 正常组大鼠四肢活动正常，精神状态良好，摄食正常，皮毛有光泽；模型组大鼠自初次免疫 7 d 后逐渐出现四肢活动异常，精神状态不佳，喜蜷卧角落，皮毛晦暗。干预第 0 天 7 组大鼠体质量比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），第 7、14、21、28 天 7 组大鼠体质量比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中第 7 天 VD 组、SMT-L 组、SMT-H 组高于 Model 组，第 14 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-H 组高于 Model 组，第 21、28 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组高于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

干预第 0、7、14、21、28 天 7 组大鼠肿胀程度比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中第 0 天 Model 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组高于 Control 组，第 7 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组低于 Model 组，第 14 天 Model 组高于 Control 组，SMT-M 组高于 Model 组，第 21 天 Model 组高于 Control 组、MTX 组，低于 VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组，第 28 天 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组低于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。

2.2 7 组大鼠 AI 评分比较 药物干预第 0、7、14、21、28 天，Control 组大鼠 AI 评分均为 0 分。干预第 0、7 天各组大鼠 AI 评分比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；干预第 14、21、28 天各组大鼠 AI 评分比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中第 14 天 SMT-H 组低于 Model 组，第 21 天 MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-H 组低于 Model 组，第 28 天 MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组低于 Model 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

2.3 7 组大鼠关节滑膜组织病理学检测结果 HE 染色组织细胞核呈蓝色，软骨呈深蓝色，细胞浆呈粉红色至桃红色，胞浆内嗜酸性颗粒呈鲜红色，胶原纤维呈淡粉色。Control 组大鼠滑膜组织结构完整，骨层清晰，衬里层滑膜细胞排列疏松，未见病理改变；Model 组大鼠滑

表 1 7 组大鼠体质量比较结果（g）

Table 1 Comparison of weight change result of rats in the seven groups

组别	只数	体质量				
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
Control 组	10	237.80 ± 16.75	249.00 ± 17.41	270.40 ± 16.75	272.20 ± 17.01	276.60 ± 20.17
Model 组	10	240.70 ± 16.26	237.70 ± 18.34	241.70 ± 19.09[a]	242.60 ± 20.73[a]	243.30 ± 23.33[a]
MTX 组	10	240.10 ± 15.92	243.40 ± 13.83	259.10 ± 11.40[b]	267.50 ± 11.73[b]	273.60 ± 11.63[b]
VD 组	10	232.30 ± 8.93	256.50 ± 12.51[b]	267.50 ± 12.47[b]	266.00 ± 11.52[b]	271.30 ± 7.68[b]
SMT-L 组	10	236.10 ± 17.62	253.80 ± 20.86[b]	262.30 ± 22.31[b]	270.60 ± 20.17[b]	268.80 ± 21.06[b]
SMT-M 组	10	236.40 ± 12.08	251.40 ± 12.97	255.00 ± 11.84	263.00 ± 13.10[b]	266.60 ± 14.39[b]
SMT-H 组	10	239.80 ± 14.82	257.90 ± 16.15[b]	265.30 ± 16.73[b]	271.90 ± 13.83[b]	272.70 ± 15.81[b]
F 值		0.39	1.99	3.52	4.27	4.27
P 值		0.88	0.08	<0.05	<0.05	<0.05

注：[a] 表示与 Control 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 Model 组比较 $P<0.05$。Model 组 = 模型组，MTX 组 = 甲氨蝶呤组，VD 组 = 维生素 D 组，SMT-L 组 = 四妙汤低剂量组，SMT-M 组 = 四妙汤中剂量组，SMT-H 组 = 四妙汤高剂量组。

表 2 7 组大鼠肿胀程度比较结果（mm）

Table 2 Comparison of the swelling degree of rats in the seven groups

组别	只数	肿胀程度				
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
Control 组	10	0.51 ± 0.07	0.44 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.87 ± 0.04
Model 组	10	2.19 ± 0.10[a]	3.02 ± 0.09[a]	3.13 ± 0.32[a]	3.45 ± 0.23[a]	3.98 ± 0.07[a]
MTX 组	10	2.22 ± 0.09[a]	2.80 ± 0.05[b]	3.08 ± 0.05	2.52 ± 0.20[b]	1.60 ± 0.18[b]
VD 组	10	2.41 ± 0.13[a]	2.81 ± 0.23[b]	3.11 ± 0.09	3.68 ± 0.08[b]	2.16 ± 0.17[b]
SMT-L 组	10	2.31 ± 0.11[a]	2.66 ± 0.19[b]	3.21 ± 0.07	3.79 ± 0.11[b]	2.72 ± 0.12[b]
SMT-M 组	10	2.24 ± 0.16[a]	2.55 ± 0.16[b]	3.33 ± 0.05[b]	3.75 ± 0.06[b]	2.42 ± 0.19[b]
SMT-H 组	10	2.39 ± 0.10[a]	2.63 ± 0.14[b]	3.16 ± 0.03	3.62 ± 0.05[b]	2.11 ± 0.03[b]
F 值		35.66	35.02	54.72	75.96	50.69
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：[a] 表示与 Control 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 Model 组比较 $P<0.05$。Model 组 = 模型组，MTX 组 = 甲氨蝶呤组，VD 组 = 维生素 D 组，SMT-L 组 = 四妙汤低剂量组，SMT-M 组 = 四妙汤中剂量组，SMT-H 组 = 四妙汤高剂量组。

表 3 7 组大鼠 AI 评分比较结果（分）
Table 3 Comparison of AI scores of rats in the seven groups

组别	只数	AI 评分				
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
Control 组	10	0	0	0	0	0
Model 组	10	12.30 ± 1.05	12.10 ± 0.87	11.90 ± 0.87	11.70 ± 1.16	11.40 ± 1.07
MTX 组	10	12.60 ± 1.83	11.90 ± 1.85	10.50 ± 2.06[a]	7.80 ± 1.87[a]	5.70 ± 1.41[a]
VD 组	10	11.90 ± 1.79	11.60 ± 1.71	10.90 ± 1.91	9.70 ± 2.16[a]	8.20 ± 1.75[a]
SMT-L 组	10	12.40 ± 1.17	12.30 ± 1.16	11.10 ± 0.87	10.20 ± 1.13[a]	8.50 ± 1.84[a]
SMT-M 组	10	12.20 ± 1.54	11.70 ± 1.82	11.30 ± 1.33	10.60 ± 1.26	8.90 ± 1.79[a]
SMT-H 组	10	11.60 ± 2.27	10.90 ± 1.52	9.70 ± 1.70[a]	8.30 ± 1.76[a]	6.40 ± 2.54[a]
F 值		89.39	98.59	86.2	68.71	46.92
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：[a] 表示与模型组比较 *P*<0.05；AI= 关节炎指数，Model 组 = 模型组，MTX 组 = 甲氨蝶呤组，VD 组 = 维生素 D 组，SMT-L 组 = 四妙汤低剂量组，SMT-M 组 = 四妙汤中剂量组，SMT-H 组 = 四妙汤高剂量组。

膜组织衬里下层大量炎性细胞浸润、滑膜细胞异常增生、关节面被破坏出现不同程度的纤维组织增生；与 Model 组比较，各给药组大鼠滑膜组织的病理状态均有改善，其中 MTX 组、SMT-H 组改善较为明显，炎性细胞浸润减少，关节面相对完整，少量纤维增生，见图 1。

2.4 7 组大鼠滑膜组织 MPO、TNF-α 表达水平比较

二氨基联苯胺法染色蛋白阳性表达为棕黄色，MPO 阳性产物主要表达于细胞核、细胞质及细胞间质，TNF-α 阳性产物主要表达于细胞质及细胞间质。免疫组化法结果显示，7 组大鼠滑膜组织 MPO、TNF-α 表达水平比较，差异有统计学意义（*P*<0.05），其中 Model 组 MPO、TNF-α 高于 Control 组，MTX 组、VD 组、SMT-H 组 MPO、TNF-α 低于 Model 组，SMT-M 组 TNF-α 低于 Model 组，差异有统计学意义（*P*<0.05），见图 2、图 3、表 4。

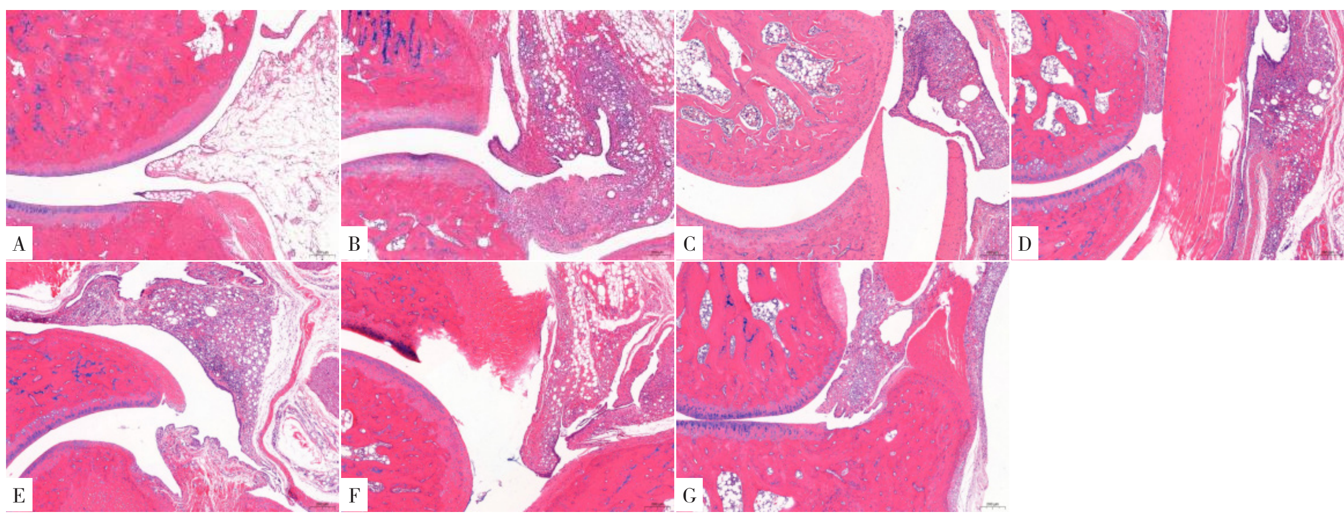
2.5 7 组大鼠血清 IL-6、25（OH）D_3、NETs 水平比较

7 组大鼠血清 IL-6、25（OH）D_3、NETs 水平比较，差异有统计学意义（*P*<0.05），其中 Model 组 IL-6、

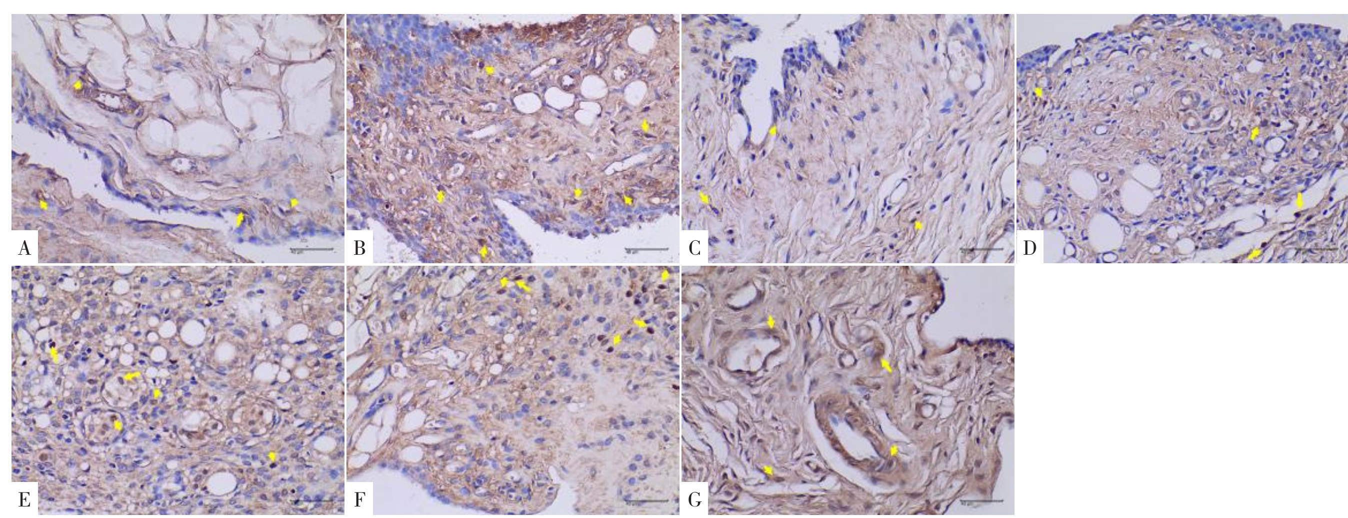
表 4 7 组大鼠滑膜组织 MPO、TNF-α 表达水平比较（%）
Table 4 Comparison of MPO and TNF-α expression levels in synovial tissue of 7 groups of rats

组别	只数	MPO	TNF-α
Control 组	6	5.38 ± 1.50	4.06 ± 2.42
Model 组	6	21.57 ± 4.71[a]	24.46 ± 4.67[a]
MTX 组	6	7.95 ± 5.11[b]	9.83 ± 2.58[b]
VD 组	6	9.30 ± 5.15[b]	8.05 ± 3.78[b]
SMT-L 组	6	20.82 ± 5.33	23.53 ± 1.42
SMT-M 组	6	17.70 ± 1.34	17.29 ± 6.16[b]
SMT-H 组	6	7.15 ± 5.42[b]	5.00 ± 2.72[b]
F 值		7.36	15.97
P 值		<0.05	<0.05

注：MPO= 髓过氧化物酶，TNF-α = 肿瘤坏死因子 α；[a] 表示与 Control 组比较 *P*<0.05，[b] 表示与 Model 组比较 *P*<0.05。



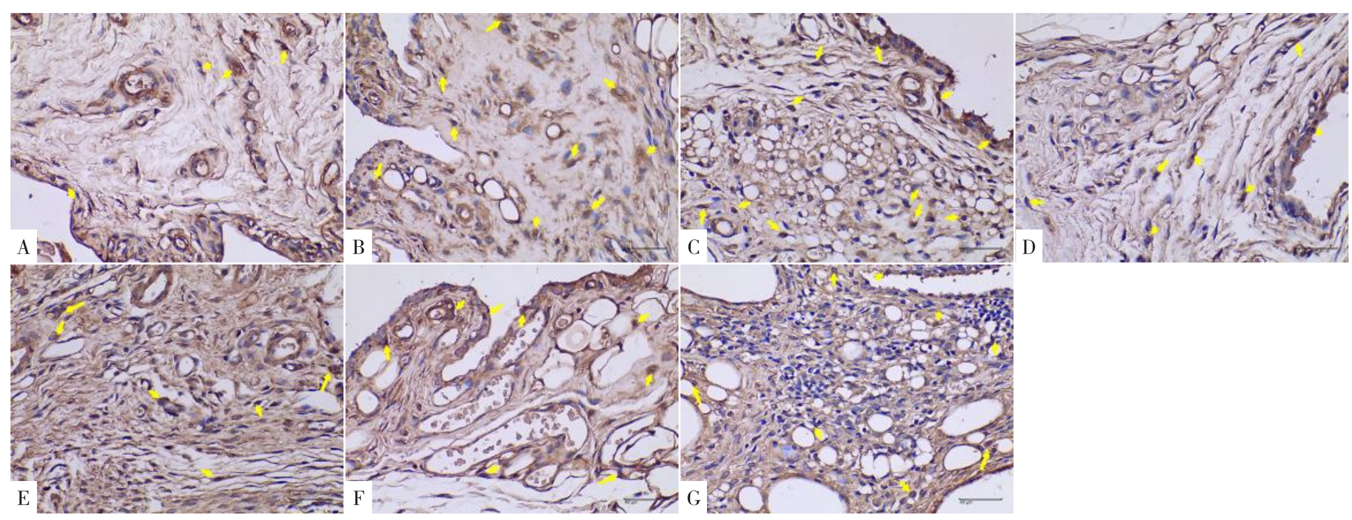
注：A 为 Control 组，B 为 Model 组，C 为 MTX 组，D 为 VD 组，E 为 SMT-L 组，F 为 SMT-M 组，G 为 SMT-H 组。
图 1 7 组大鼠关节滑膜组织病理学检测结果（HE 染色，×50）
Figure 1 Results of joint synovial histopathology in 7 groups of rats



注：A 为 Control 组，B 为 Model 组，C 为 MTX 组，D 为 VD 组，E 为 SMT-L 组，F 为 SMT-M 组，G 为 SMT-H 组。

图 2 7 组大鼠滑膜组织 MPO 表达情况（免疫组化法，×40）

Figure 2 MPO expression in synovial tissue of 7 groups of rats



注：A 为 Control 组，B 为 Model 组，C 为 MTX 组，D 为 VD 组，E 为 SMT-L 组，F 为 SMT-M 组，G 为 SMT-H 组。

图 3 7 组大鼠滑膜组织 TNF-α 表达情况（免疫组化法，×40）

Figure 3 Expression of TNF-α in synovial tissue of 7 groups of rats

NETs 高于 Control 组，25（OH）D_3 低于 Control 组；MTX 组、VD 组、SMT-H 组 IL-6、NETs 低于 Model 组，25（OH）D_3 高于 Model 组；SMT-M 组 NETs 低于 Model 组，差异均有统计学意义（P<0.05），见表 5。

2.6 7 组大鼠关节滑膜组织 CYP24A1、CYP27B1、MPO、VDR、NE 相对表达量比较 7 组大鼠 CYP24A1、CYP27B1、MPO、VDR、NE 相对表达量比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中 Model 组 CYP24A1 高于 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-M 组、SMT-H 组，CYP27B1、VDR 低于 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-M 组、SMT-H 组，MPO 高于 Control 组、MTX 组、VD 组、SMT-L 组、SMT-M 组、SMT-H 组，NE 高于 Control 组、VD 组、SMT-M 组、SMT-H 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 6、图 4。

表 5 7 组大鼠血清 IL-6、25（OH）D_3、NETs 水平比较

Table 5 Comparison of serum levels of IL-6，25（OH）D_3 and NETs in 7 groups

组别	只数	IL-6（pg/mL）	25（OH）D_3（ng/mL）	NETs（ng/mL）
Control 组	6	41.85 ± 10.53	32.19 ± 5.24	23.80 ± 3.01
Model 组	6	90.50 ± 17.57[a]	19.54 ± 3.93[a]	39.38 ± 5.62[a]
MTX 组	6	37.63 ± 7.33[b]	28.22 ± 5.07[b]	26.78 ± 4.95[b]
VD 组	6	46.14 ± 14.97[b]	27.07 ± 5.01[b]	29.49 ± 4.90[b]
SMT-L 组	6	86.39 ± 13.80	19.73 ± 4.32	37.16 ± 4.64
SMT-M 组	6	74.29 ± 15.08	21.44 ± 2.31	30.95 ± 3.21[b]
SMT-H 组	6	53.73 ± 17.74[b]	25.33 ± 1.33[b]	31.33 ± 5.89[b]
F 值		14.06	7.97	8.06
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

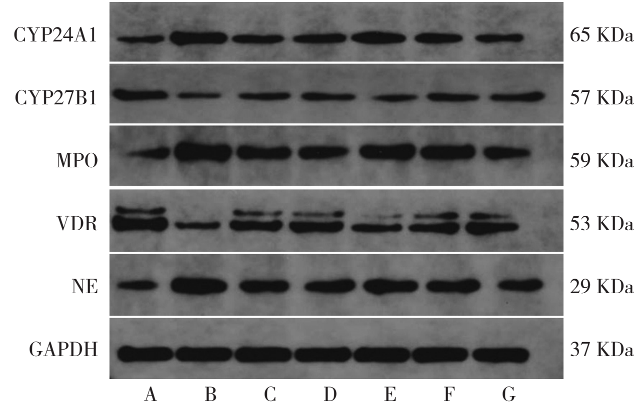
注：IL-6= 白介素 6，25（OH）D_3=25- 羟基维生素 D，NETs= 中性粒细胞胞外诱捕网；[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示与模型组比较 P<0.05。

表 6　7 组大鼠滑膜组织 CYP24A1、CYP27B1、MPO、VDR、NE 相对表达量比较

Table 6　Comparative expression of CYP24A1，CYP27B1，MPO，VDR and NE in synovial tissue of 7 groups of rats

组别	只数	CYP24A1	CYP27B1	MPO	VDR	NE
Control 组	6	0.24 ± 0.11	0.64 ± 0.07	0.25 ± 0.02	0.68 ± 0.08	0.27 ± 0.05
Model 组	6	0.76 ± 0.15[a]	0.19 ± 0.03[a]	0.78 ± 0.06[a]	0.20 ± 0.08[a]	0.73 ± 0.10[a]
MTX 组	6	0.42 ± 0.09[b]	0.36 ± 0.06[b]	0.54 ± 0.05[b]	0.43 ± 0.03[b]	0.57 ± 0.14
VD 组	6	0.41 ± 0.16[b]	0.41 ± 0.09[b]	0.36 ± 0.12[b]	0.49 ± 0.05[b]	0.43 ± 0.05[b]
SMT-L 组	6	0.61 ± 0.13	0.23 ± 0.04	0.59 ± 0.08[b]	0.26 ± 0.06	0.64 ± 0.06
SMT-M 组	6	0.47 ± 0.20[b]	0.39 ± 0.05[b]	0.52 ± 0.08[b]	0.40 ± 0.07[b]	0.50 ± 0.09[b]
SMT-H 组	6	0.32 ± 0.14[b]	0.47 ± 0.07[b]	0.36 ± 0.04[b]	0.52 ± 0.06[b]	0.44 ± 0.12[b]
F 值		4.24	16.17	16.89	17.96	7.05
P 值		<0.05	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05

注：CYP24A1=24- 羟化酶，CYP27B1=1-α 羟化酶，MPO= 髓过氧化物酶，VDR= 维生素 D 受体，NE= 弹性蛋白酶；[a] 表示与空白组比较 $P<0.05$，[b] 表示与模型组比较 $P<0.05$。



注：CYP24A1=24- 羟化酶，CYP27B1=1-α 羟化酶，MPO= 髓过氧化物酶，VDR= 维生素 D 受体，NE= 弹性蛋白酶，GAPDH=3- 磷酸甘油醛脱氢酶；A 为 Control 组，B 为 Model 组，C 为 MTX 组，D 为 VD 组，E 为 SMT-L 组，F 为 SMT-M 组，G 为 SMT-H 组。

图 4　7 组大鼠关节滑膜组织 CYP24A1、CYP27B1、MPO、VDR、NE 蛋白质印迹法检测结果

Figure 4　CYP24A1，CYP27B1，MPO，VDR，NE detected by Western Blot in synovial tissue of 7 groups of rats

3　讨论

中医认为 RA 的病因主要为素体虚弱、正气不足、脏腑虚衰[18]。《诸病源候论》指出“人体虚，腠理开”，导致风、寒、湿三种外邪入侵，证候复杂，病势反复缠绵；《素问·评热病论篇》云：“邪之所凑，其气必虚”[19]。四妙汤益气和血，补虚生血，组方切合 RA 基本病机，方中黄芪、当归、金银花、甘草均属于临床治疗 RA 的高频次用药[20]。现代药理研究发现，甘草查尔酮 A 是存在于甘草的活性物质，具有抗氧化、抗炎等多种药理作用[21]，甘草中含有的柚皮素可通过影响大鼠血清中 TNF-α 等炎性因子的含量，改善关节炎大鼠的炎症细胞浸润[22]。黄芪、金银花、甘草中都含有的有效成分槲皮素和山奈酚能显著改善 RA，槲皮素是天然黄酮类化合物，通过降低氧化应激反应、抑制细胞增殖和迁移、减少炎性因子、促进滑膜成纤维细胞因子（FLS）的凋亡进而抑制滑膜炎症，减少 RA 的骨损害[23]，山奈酚可显著抑制丝裂原活化蛋白激酶通路的激活，降低 RA 中 FLS 的迁移和侵袭，能有效减轻 CIA 小鼠关节炎的严重程度[24]。

本研究选择与人类 RA 病理特征高度相似的胶原诱导法构建的 CIA 大鼠模型，实验结果表明，Model 组大鼠出现体质量下降、足趾关节肿胀、精神状态异常等一般状况，经四妙汤干预后，大鼠体质量明显增加、足肿胀度降低、关节指数评分降低、滑膜组织病理状态明显改善。IL-6、TNF-α 作为引起 RA 持续性滑膜炎的重要炎症反应标志物，其水平与 RA 疾病程度存在正相关[25]。四妙汤干预后，可显著降低 CIA 大鼠血清 IL-6 水平，显著降低滑膜组织中 TNF-α 阳性表达。表明四妙汤能有效改善 RA 病理症状，抑制 RA 的炎症反应。

VD 缺乏与 RA 发病率和严重程度有关[5]。人体获取 VD 的形式是 VD_2 和 VD_3，而 VD_2 对维生素 D 结合蛋白（DBP）的亲和力较低，生物利用度降低，因此 VD 在人体内发挥免疫作用的形式主要是 VD_3。VD_3 依靠位于肝脏的 25- 羟化酶（CYP27A1）羟化为 25（OH）D_3，产生活性 1，25（OH）$_2D_3$，由 CYP27B1 介导，1，25（OH）$_2D_3$ 可作用于 VDR 发挥生物学效应。CYP27B1 是维生素 D 活化的关键酶，CYP24A1 是 25（OH）D_3、1，25（OH）$_2D_3$ 失活的羟化酶[26]。本研究结果显示，模型组大鼠血清 25（OH）D_3 水平显著降低，滑膜组织 CYP27B1、VDR 蛋白表达显著降低，CYP24A1 蛋白表达显著升高。四妙汤干预后，显著上调大鼠血清 25（OH）D_3 水平及滑膜组织 CYP27B1、VDR 蛋白表达，显著下调 CYP24A1 蛋白表达。表明四妙汤可能通过调控维生素 D 系统实现对 RA 的治疗作用。

免疫系统的作用始终贯穿 RA 的发生、发展，中性粒细胞作为固有免疫吞噬细胞[27]，是人体非特异性免疫的重要组成部分，其经过刺激释放到细胞外的 NETs

在 RA 中，是自身免疫抗原的重要来源，NETs 表达增加与 RA 疾病状态相关[28]，NETs 通过诱导 ACPA 产生，刺激 IL-6、TNF-α、IL-15 等炎性因子的分泌，破坏机体免疫，参与 RA 病理过程。NETs 的蛋白质组分 NE 可降解关节软骨，加重 RA 的炎症反应及骨破坏。NETs 及其产物 MPO、NE 可作为 RA 疾病活性标志物[29]。实验结果显示，模型组大鼠血清 NETs 水平显著升高，滑膜组织 MPO、NE 蛋白表达显著升高，IHC 结果显示 MPO 阳性表达显著升高，四妙汤高剂量及 VD 干预后，则显著降低大鼠血清 NETs 水平、滑膜组织 MPO、NE 蛋白表达、MPO 阳性表达。表明四妙汤与 VD 改善 RA 与抑制 NETs 的形成及其成分 MPO、NE 的释放相关。

综上所述，四妙汤可能通过调控 VD 系统抑制 NETs 的形成有效改善 CIA 大鼠 RA 病理症状，为临床治疗 RA 提供了实验基础。

作者贡献：罗书曼负责文章的构思与撰写，数据处理及分析；朱星负责文章的质量控制及审校；罗书曼、陈帅、李文、董右青负责动物模型的制备、实验指标的检测；何昌禄、周艳负责文献和资料收集、整理，文章修订；陈云志提出实验的研究思路，负责实验的实施推进与可行性分析，对文章最终版本进行审核。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] PRASAD P，VERMA S，SURBHI，et al. Rheumatoid arthritis：advances in treatment strategies[J]. Mol Cell Biochem，2023，478（1）：69-88. DOI：10.1007/s11010-022-04492-3.

[2] COSTELLO R E，MARSDEN A，MOVAHEDI M，et al. The effect of glucocorticoid therapy on mortality in patients with rheumatoid arthritis and concomitant type II diabetes：a retrospective cohort study［J］. BMC Rheumatol，2020，4：4. DOI：10.1186/s41927-019-0105-4.

[3] HARRISON S R，LI D Y，JEFFERY L E，et al. Vitamin D，autoimmune disease and rheumatoid arthritis［J］. Calcif Tissue Int，2020，106（1）：58-75. DOI：10.1007/s00223-019-00577-2.

[4] MYERS L K，WINSTEAD M，KEE J D，et al. 1，25-dihydroxyvitamin D3 and 20-hydroxyvitamin D3 upregulate LAIR-1 and attenuate collagen induced arthritis［J］. Int J Mol Sci，2021，22（24）：13342. DOI：10.3390/ijms222413342.

[5] VERMA S，CHATURVEDI V，GANGULY N K，et al. Vitamin D deficiency：concern for rheumatoid arthritis and COVID-19?［J］. Mol Cell Biochem，2021，476（12）：4351-4362. DOI：10.1007/s11010-021-04245-8.

[6] PUNCEVICIENE E，GAIZEVSKA J，SABALIAUSKAITE R，et al. Vitamin D and VDR gene polymorphisms' association with rheumatoid arthritis in Lithuanian population［J］. Medicina，2021，57（4）：346. DOI：10.3390/medicina57040346.

[7] VAN BRUGGEN S，MARTINOD K. The coming of age of neutrophil extracellular traps in thrombosis：where are we now and where are we headed?［J］. Immunol Rev，2023，314（1）：376-398. DOI：10.1111/imr.13179.

[8] 李晓红. 穿心莲内酯通过调节中性粒细胞活性治疗类风湿关节炎的机制研究［D］. 北京：北京中医药大学，2020.

[9] AGRAZ-CIBRIAN J M，GIRALDO D M，URCUQUI-INCHIMA S. 1，25-Dihydroxyvitamin D3 induces formation of neutrophil extracellular trap-like structures and modulates the transcription of genes whose products are neutrophil extracellular trap-associated proteins：a pilot study［J］. Steroids，2019，141：14-22. DOI：10.1016/j.steroids.2018.11.001.

[10] HANDONO K，SIDARTA Y O，PRADANA B A，et al. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus［J］. Acta Med Indones，2014，46（3）：189-198.

[11] ZHANG H M. Standardized diagnosis-therapy and stepwise treatment for knee osteoarthritis［J］. Zhongguo Gu Shang，2019，32（5）：391-395. DOI：10.3969/j.issn.1003-0034.2019.05.001.

[12] 王妍曦，桑希生. 基于《黄帝内经》对“痹”内涵及痹病分类的认识［J］. 中国中医基础医学杂志，2021，27（6）：916-917，1010. DOI：10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2021.06.011.

[13] 于鹰，李玉清. 张灿玾临证方药运用经验［J］. 山东中医药大学学报，2019，43（2）：111-114. DOI：10.16294/j.cnki.1007-659x.2019.02.001.

[14] 张孟之，管连城，秦忠，等. 当归补血汤对维甲酸致骨质疏松模型大鼠卵巢 CYP24A1 和 ERα 表达的影响［J］. 中药新药与临床药理，2020，31（5）：502-507. DOI：10.19378/j.issn.1003-9783.2020.05.002.

[15] 何艳新，田乐，吉聪，等. 当归补血汤含药血清对 TNF-α 诱导 HFLS-RA 细胞增殖的影响［J］. 中成药，2022，44（4）：1277-1280. DOI：10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.044.

[16] VITA A A，ALJOBAILY H，LYONS D O，et al. Berberine delays onset of collagen-induced arthritis through T cell suppression［J］. Int J Mol Sci，2021，22（7）：3522. DOI：10.3390/ijms22073522.

[17] 魏伟，吴希美，李元建. 药理实验方法学［M］. 4 版. 北京：人民卫生出版社，2010.

[18] 韩宇飞，高明利，刘东武. 类风湿性关节炎的发病机制研究进展综述［J］. 中国卫生标准管理，2021，12（1）：162-165. DOI：10.3969/j.issn.1674-9316.2021.01.061.

[19] 许文亚，刘秋红，李晓茹. 类风湿关节炎从虚论治［J］. 中外医疗，2016，35（34）：195-198. DOI：10.16662/j.cnki.1674-0742.2016.34.195.

[20] 张林华. 基于数据挖掘的中医治疗风湿病临床用药规律与作用机制研究［D］. 北京：北京中医药大学，2019.

[21] XU K D，MIAO Y，LI P，et al. Licochalcone A inhibits cell growth through the downregulation of the Hippo pathway via PES1 in cholangiocarcinoma cells［J］. Environ Toxicol，2022，37（3）：564-573. DOI：10.1002/tox.23422.

[22] 果彤. 运脾解毒通络祛湿方治疗类风湿关节炎的网络靶标预测及机制初探［D］. 北京：北京中医药大学，2020.

[23] TANG M S，ZENG Y，PENG W J，et al. Pharmacological Aspects of Natural Quercetin in Rheumatoid Arthritis［J］. Drug Des Devel

Ther，2022，16：2043-2053. DOI：10. 2147/DDDT. S364759.

[24] PAN D M，LI N，LIU Y Y，et al. Kaempferol inhibits the migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by blocking activation of the MAPK pathway [J]. Int Immunopharmacol，2018，55：174-182. DOI：10.1016/j.intimp.2017.12.011.

[25] 林婉娜，苏慧琳，李慧敏，等 . 黄芪桂枝五物汤抗类风湿性关节炎的作用机制 [J] . 中国实验方剂学杂志，2022，28（9）：9-15. DOI：10.13422/j.cnki.syfjx.20220607.

[26] 李倩，吴雍真，管连城，等 . 黄芪含药血清对衰老骨髓间充质干细胞 CYP24A1，CYP27B1 mRNA 和蛋白的影响 [J] . 中国实验方剂学杂志，2020，26（17）：49-55. DOI：10.13422/j.cnki.syfjx.20201738.

[27] 张礼节，党万太 . 中性粒细胞胞外诱捕网在自身免疫性疾病中的作用及机制研究进展 [J] . 现代免疫学，2022，42（6）：536-540.

[28] WANG W，PENG W C，NING X W. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis [J] . Int J Rheum Dis，2018，21（2）：415-421. DOI：10.1111/1756-185X.13226.

[29] 周琦，孙慧娟，刘树民 . 中性粒细胞胞外诱捕网的形成及其在自身免疫性疾病中的作用 [J] . 中国中药杂志，2021，46（21）：5568-5575. DOI：10.19540/j.cnki.cjcmm.20210726.702.

（收稿日期：2023-04-18；修回日期：2022-07-18）

（本文编辑：邹琳）